



PATENT 2793-1-001PCT/CIP

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

APPLICANTS : Florian Von Der Mülbe et al.
SERIAL NO. : 10/729,830
FILED : December 5, 2003
FOR : PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING A
STABILISED mRNA OPTIMISED FOR TRANSLATION IN
ITS CODING REGIONS

Certificate of Mailing Under 37 CFR 1.8

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to COMMISSIONER FOR PATENTS, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 on February 13, 2004.

Carolyn Di Meglio
(Name of Depositor)

Carolyn Di Meglio 2/13/04
(Signature and Date)

PETITION FOR GRANT OF PRIORITY UNDER 35 USC 119

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicant hereby petitions for grant of priority of the present Application on the basis of the following prior filed foreign Application:

<u>COUNTRY</u>	<u>SERIAL NO.</u>	<u>FILING DATE</u>
GERMANY	DE 101 27 283.9	JUNE 5, 2001

To perfect Applicant's claim to priority, a certified copy of the above listed prior filed Application is enclosed.

Acknowledgment of Applicant's perfection of claim to priority is accordingly requested.

Respectfully submitted,

David A. Jackson
David A. Jackson
Attorney for Applicant
Registration No. 26,742

KLAUBER & JACKSON
411 Hackensack Avenue
Hackensack, NJ 07601
(201)487-5800
February 2, 2004

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 27 283.9

Anmeldetag: 5. Juni 2001

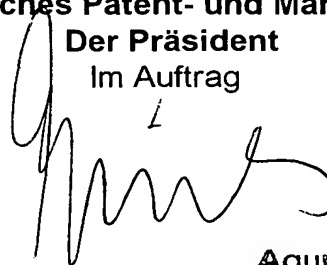
Anmelder/Inhaber: Florian v o n d e r M ü l b e , Tübingen/DE

Bezeichnung: Eine mRNA, stabilisiert und optimiert für die Translation in ihren translatierten Bereichen, für den Einsatz als Therapeutikum

IPC: C 12 N 15/63

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 18. Dezember 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag



Agurks



Florian von der Mülbe
Auf der Morgenstelle 18
72076 Tübingen

31.5.2001

Eine mRNA, stabilisiert und optimiert für die Translation in ihren translatierten Bereichen, für den Einsatz als Therapeutikum

Die Erfindung betrifft ein Impfverfahren, die Konstruktion eines Impfstoffes und ein Impfverfahren mit diesem Impfstoff.

Gentherapie und genetische Vakzinierung sind Methoden der molekularen Medizin, deren Anwendung in der Therapie und Prävention von Erkrankungen erhebliche Konsequenzen für die medizinische Praxis haben wird. Beide Methoden beruhen grundsätzlich auf der Einbringung von Nukleinsäuren in Zellen oder Gewebe des Patienten, sowie der anschließenden Verarbeitung der durch die eingebrachten Nukleinsäuren enthaltenen Inhalte in Information ("Expression").

Der Einsatz der Nukleinsäure RNA als Therapeutikum ist als wesentlich sicherer einzustufen als der Einsatz von DNA. RNA birgt nicht die Gefahr, stabil in das chromosomale Genom zu integrieren, sie besitzt keine viralen Sequenzen (wie z.B. Promotoren von DNA-Gentherapievektoren), auch ist sie wesentlich einfacher *in vivo* abbaubar. Somit ist für Methoden der molekularen Medizin RNA das Therapeutikum der Wahl.

Allerdings bedürfen auf RNA-Expressions-Systemen beruhende medizinische Methoden vor ihrer breiten Anwendung noch der Lösung einiger grundsätzlicher Probleme. Eines dieser Probleme ist der sichere, Zell- oder Gewebe-spezifische effiziente Transfer der Nukleinsäuren ins Gewebe. Da sich RNA in Lösung als sehr instabil erweist, kann durch die herkömmlichen Methoden, wie sie für DNA angewendet werden, RNA nicht oder nur sehr ineffizient als Impfstoff zum Einsatz kommen.

Mögliche Lösungen für dieses Problem der Instabilität *ex vivo* wurden in unserer Anmeldung "Transfer of mRNA using polycationic compounds" (Anmeldung EP -1083232) skizziert. Zentraler Aspekt der dort erörterten Erfindung ist eine Verabreichung von RNA zusammen mit Schutz-Molekülen, die an die RNA reversibel binden.

Für ein weiteres Problem wurde durch die vorliegende Erfindung eine Lösung erarbeitet: Wesentlicher Nachteil von RNA im Einsatz als Therapeutikum im Vergleich zu DNA ist die Instabilität sowie oftmals schlechte Expression *in vivo*.

1) Problem Instabilität: Für die Instabilität sind RNA abbauende Enzyme, sog. RNasen verantwortlich.

Der natürliche Abbau der mRNA ist im Cytoplasma der Zellen sehr fein reguliert. Hierzu gibt es mehrere bekannte Mechanismen: So ist für eine funktionale mRNA (messenger RNA) die endständige Struktur überaus wichtig. Am 5'-Ende befindet sich die so genannte "Cap-Struktur" (modifiziertes Nucleotid Guanodin) und am 3'-Ende eine Abfolge von bis zu 200 Adenosin-Nukleotiden (sog. Poly-A-Schwanz).

Über diese Strukturen wird die RNA als mRNA erkannt und der Abbau reguliert. Es gibt noch viele weitere Prozesse, die RNA stabilisieren bzw. destabilisieren. Viele dieser Prozesse sind noch unbekannt, aber oftmals scheint eine Wechselwirkung zwischen RNA und Protein dafür maßgeblich zu sein. Zum Beispiel wurde kürzlich ein "mRNA surveillance System" beschrieben (Hilleren und Parker, Annu. Rev. Genet. 1999, 33:229-60), bei dem über

bestimmte Feedback-Protein-Wechselwirkungen im Cytosol unvollständige oder Nonsense-mRNAs erkannt werden und dem Abbau zugänglich gemacht werden. Ein Hauptteil dieser Prozesse wird durch Exonucleasen (RNasen) vollzogen.

2) Problem Translationseffizienz: Für eine effiziente Translation der RNA ist es wichtig, dass sogenannte Ribosomen an das Startcodon binden können und die Gensequenz ablesen können. Weiterhin kommt es auf die Anzahl der vorhandenen tRNAs an, die eine sequenzspezifische Aminosäure tragen.

Wesentlich scheint aber auch die Art der Sequenzabfolge des Gens zu sein. Somit kommt der Region der RNA, an die die Ribosomen binden, eine besondere Bedeutung zu.

Ein RNA-Konstrukt, das die beschriebenen Probleme minimieren würde und als Therapeutikum in einen Organismus oder Zellen transferiert werden kann, wäre also von erheblichen praktischen Interesse.

Erfindungsgemäße technische Lösung

Konstruktion eines Plasmids für die *in vitro*-Transkription:

RNA wird generell über ein DNA-Molekül *in vitro* transkribiert. Dieses DNA-Molekül besitzt einen geeigneten Promotor für die *in vitro*-Transkription (vorzugsweise einen T7- oder SP6-Promotor), die gewünschte Sequenz-Abfolge der RNA plus einem Terminationssignal für die *in vitro*-Transkription. Erfindungsgemäss wird das DNA-Molekül, welches die Matrize des darzustellenden RNA-Konstruktes bildet, durch fermentative Vermehrung und anschließender Isolierung als Teil eines in Bakterien replizierbaren Plasmids synthetisiert. Besagtes DNA-Molekül wird dann aus dem Plasmid, in dem es in einfacher oder mehrfacher Kopie vorliegen kann, durch Verdau mit Restriktionsendonucleasen ausgeschnitten, die an den entstehenden Schnittstellen kurze einzelsträngige Überhänge bilden. Es können so über kurze synthetisch hergestellte DNA-Oligonucleotide oder durch ganze ausgeschnittenen Gene die gewünschte Nukleotidsequenz nach dem Fachmann geläufigen molekularbiologischen Methoden in einem Plasmid hergestellt werden.

Kern der Erfindung ist nun, ein Plasmid zu konstruieren, von dem eine RNA transkribiert werden kann, die den Erfordernissen der Gentherapie hinsichtlich Stabilität und Translations-Effizienz entspricht. Diese RNA wird in Zellen oder in einen Organismus transferiert. Aus diesem Grund werden bestimmte Nukleotid-Sequenzen in das Plasmid kloniert.

1) Codon-Modifikationen im translatierten Bereich der zu transkribierenden mRNA

Wesentlich für eine effiziente Translation ist die Sequenzabfolge des zu translatierenden Bereiches einer RNA. Die Zusammensetzung und die Abfolge der verschiedenen Nukleotide spielt hierfür eine grosse Rolle. Sequenzen mit einem erhöhten G (Guanosin)/C (Cytosin) Gehalt sind als stabiler zu betrachten, als Sequenzen mit einem hohen A (Adenosin)/U (Uracil) Gehalt. Deshalb ist es das Ziel, unter Beibehaltung der translatierten Aminosäureabfolge, die Codons so zu variieren, dass sie vermehrt G/C-Nukleotide beinhalten. Da mehrere Codons bei Eukaryonten für ein und dieselbe Aminosäure codieren (codon usage), können die für die Stabilität günstigsten Codons herausgesucht werden.

Weiterhin bestimmt eine unterschiedliche Häufigkeit im Vorkommen von tRNAs in Säugetierzellen die Translationseffizienz. Tauchen in einer RNA-Gensequenz vermehrt sogenannte „seltene“ Codons auf, so werden die Gene wesentlich schlechter durch die Ribosomen translatiert. Deshalb ist es das Ziel, in Gensequenzen solcher Art Codons einzufügen, für die häufig vorkommende tRNAs zur Verfügung stehen. Wichtig für diesen

Zweck ist es, den hohen sequentiellen G/C-Anteil mit „häufigen“ Codons zu verknüpfen, ohne die Aminosäuresequenz des Genproduktes zu verändern. Hierfür wurde ein Computerprogramm erstellt, dass die Sequenzen nach den vorgestellten Parametern optimiert. Die optimierte Gensequenz kann durch chemische Synthese oder dem Fachmann geläufige Methode der Ligation von chemisch synthetisierten Oligonucleotiden erstellt werden und in ein Transkriptions-Plasmid eingefügt werden.

2) Sequenz-Modifikationen im translatierten Bereich der zu transkribierenden mRNA

In Gensequenzen von eukaryontischer mRNA gibt es destabilisierende Elemente (DSE), an die Signalproteine binden und den enzymatischen Abbau *in vivo* regulieren. Durch Codon usage können diese Sequenzen verändert werden, dass sie nicht mehr als DSE fungieren und keinen destabilisierenden Effekt auf die RNA ausüben.

3) Einsatz von Analoga natürlich vorkommender Nukleotide und Basen

Die in den Zellen vorkommenden RNA-abbauenden Enzyme erkennen als Substrat vorzugsweise natürliche Nukleotide. Durch Einfügen von Analoga dieser Nukleotide kann der Abbau der RNA erschwert werden bzw. die Translationseffizienz verstärkt oder erniedrigt werden.

Die Nukleotide dieser zu klonierenden Sequenzen können auch aus Analoga natürlicher Nukleotide bestehen. Solche Analoga können zum Beispiel folgende Moleküle darstellen (ausgewählte Beispiele): Phosphoramidate, Peptid- Nukleinsäuren, Phosphorothioate (Abbildung 1, Abbildung 2), Methylphosphonate und weitere. Weiterhin können Analoga der Basen zum Einsatz kommen, zum Beispiel: 7-Deazaguanosin, 5-Methyl Cytosin, Inosin und andere. Beschreibungen der Herstellung dieser Analogas können im Folgenden US-Patenten gefunden werden: 4373071; 4401796; 4415732; 4458066; 4500707; 4668777; 4973679; 5047524; 5132418; 5153319; 5262530 und 5700642.

Diese Analoga können in Regionen zum Einsatz kommen, die translatiert werden.

Beispiel für die Herstellung einer RNA Vakzine die für β -Galactosidase (LacZ) codiert:

Es wird ein RNA Konstrukt; das die erfindungsgemäße, optimierte Sequenz des bakteriellen Gens lacZ beinhaltet; erstellt:

Die Sequenz wird durch eine erfindungsgemäße Software in Bezug auf ihren G/C-Gehalt optimiert. Es kann ein G/C-Gehalt von 69% (im Vgl. zur natürlichen Sequenz von 51%) erzielt werden. Durch die Synthese überlappender Oligonukleotide, die diese modifizierte Sequenz tragen, kann die optimierte Sequenz nach dem für den Fachmann gängigen Methoden erstellt werden. Die endständigen Oligonucleotide besitzen Restriktionsschnittstellen: Vorzugsweise an 5'- eine EcoRV- Restriktionsstelle sowie an 3'- eine Restriktionsschnittstelle BglII. Über EcoRV/BglII kann lacZ in ein Plasmid kloniert werden.

Als Ausgangsvektor für die *in vitro*-Transkription wird das Plasmid pT7Ts (Genbankeintrag U26404, Ref: Lai et al., Development 121, 2349-2360 (1995)) verwendet.

pT7Ts enthält als untranslatierte Regionen, Sequenzen aus dem Krallenfrosch *Xenopus* an 5' und an 3'. Dieses Plasmid wird EcoRV/BglII linearisiert

Das fertige Konstrukt pT7Ts-lacZ wird durch Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt und 2 μ g davon mit dem für den Fachmann geläufigen Methode *in vitro* transkribiert.

Gemäß Patentanmeldung EP -1083232 wird diese stabilisierte, optimierte RNA nach Aufreinigung in einen Organismus oder in Zellen transferiert.

Ansprüche

- 1) Eine Methode des Transfers von stabilisierter und in ihrer Translation optimierter mRNA in Zellen oder in einen Organismus zur Erzielung von therapeutischem Nutzen..
- 2) Eine rekombinante RNA nach Anspruch 1, die in folgender Abfolge beinhaltet: Eine Cap-Struktur, eine Ribosomen-Bindungsstelle mit einem Initiationscodon für die ribosomale Translation, ein Gen, das für das gewünschte Genprodukt kodiert sowie den Anhang einer Poly-A-Sequenz.
- 3) Eine RNA nach den vorherigen Ansprüchen, dadurch gekennzeichnet, dass die translatierten Regionen einen stabilisierenden Effekt auf die mRNA ausüben.
- 4) Einen stabilisierenden Effekt der nach vorherigen Anspruch dadurch gekennzeichnet dass er durch den Austausch von Nukleotiden unter Beibehaltung der Aminosäuresequenz des Genproduktes erzielt wird.
- 5) Einen stabilisierenden Effekt nach vorherigen Ansprüchen dadurch gekennzeichnet, dass er durch die Erhöhung des G/C-Gehalts der translatierten Regionen unter Beibehaltung der Aminosäuresequenz des Genproduktes erzielt wird.
- 6) Einen stabilisierenden Effekt nach vorherigen Ansprüchen dadurch gekennzeichnet, dass destabilisierende Elemente (DSE) durch den Austausch von Nukleotiden entfernt werden.
- 7) Eine RNA nach den vorherigen Ansprüchen dadurch gekennzeichnet, dass die translatierten Regionen einen Effekt auf die mRNA ausüben, der sich durch eine erhöhte Translationseffizienz auszeichnet.
- 8) Einen Effekt auf die Translation nach Anspruch 7 dadurch gekennzeichnet, dass dieser durch den Austausch von Nukleotiden unter Beibehaltung der Aminosäuresequenz des Genproduktes erzielt wird.
- 9) Einen Effekt auf die Translation nach vorherigen Ansprüchen dadurch gekennzeichnet, dass er durch den Einsatz von Codons erzielt wird, die von häufig vorkommenden tRNAs erkannt werden.
- 10) Eine Software, über die sich die optimierten Nukleotidsequenzen errechnen lassen.
- 11) Eine RNA nach den vorherigen Ansprüchen dadurch gekennzeichnet, dass ihre translatierten Regionen aus Nukleotid-Analoga bestehen können.
- 12) Nukleotid-Analoga aus vorherigen Ansprüchen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass ihr Grundgerüst aus Phosphoramidate, Peptid-Nukleinsäuren, Phosphorothioate, Methylphosphonate und ihre Basen aus 7-Deazaguanosin, 2'-O-Methylpyrimidine, N6,2'-O-Dimethylpyrimidine, N6,N6,O-2'-Trimethylpyrimidine, 7-Methylpurine, 2'-O-Methylpurine, N2,7-Dimethylpurine, N2,N2,7-Trimethylpurine und Inosin bestehen können.

Abbildungen:

LacZ-Sequenz, Originalgen aus dem Vektor pch110 (Pharmacia), G/C Gehalt bei 51%

aagcttgatctctataatctcgcgcaacctattttccctcgaacactttttaagccgta
gauaaacaggcugggacacuucacauagcgcaaaaaaucaucgucaccugggacauug
cagauccaugcacguaaacucgcaagccgacugaugccuucugaacauggaaaggcauu
auugccguaagccguggcgguucgguaccggugggugaagaccagaaacagcaccucgaa
cugagccgcgauauugcccagcguuuaacgcgcuguauggcgagaucauccgucguu
uuacaacgucgugacugggaaaaccuggcguuacccaacuuaucgccuugcagcacau
ccccuuucgcccagcuggcguaauagcgaagaggcccgaccgaucgcccuucccaacag
uugcgcagccugaauaggcgaauggcgcuuugccugguuuccggcaccagaagcggugccg
gaaagcuggcuggagugcgauuuccugaggccgauacugucgucgucuccucaaacugg
cagaugcacgguuacgaugcgcccaucuaaccaaagcuaaccuaucccuuacggucaau
ccgcccguuugucccagggagaauccgacggguuguuacucgcucacauuuauugugau
gaaagcuggcuacaggaaggccagacgcgaauuuuuuugauggcguuaacucggcgguu
caucuguggugcaacggcgucguggucgguuacggccaggacagucguuugccgucugaa
uuugaccugagcgcauuuuuacgcgcggagaaaaccgccucgcggugauggugcugcgu
uggagugacggcaguuauucggaagaucaaggauauguggcggaugagcggcauuuuccgu
gacgucucguugcugcauaaaccgacuacacaaucagcgauuuccauguugccacucgc
uuuaaugaugauuucagccgcgcuuacugggaggcugaaguucagauugcggcgaguug
cgugacuaccuacggguaacaguuuucuuuauuggcaggggugaaacgcaggucgccagcggc
accgcgccuuucggcgguuuaauuacgaugagcguggugguuauugccgaucgcgucaca
cuacgucugaacgucgaaaacccgaaacuguggagcgccgaaaucccgaucucuaucgu
gcggugguugaacugcacaccgccgacggcacgcugauugaagcagaagccugcgauguc
gguuuuccgcgaggugcggauugaaauggucugcugcugcugaacggcaagccguugcug
auucgaggcguaaccgucacgagcauauccucugcauggucaggucaggaugagcag
acgauggugcaggauauccugcugaugaagcagaacaacuuuaacgccgugcgcguuucg
cauuauccgaaccuaccgucugguuacacgcugugcgaccgcuacggccuguauguggug
gaugaagccaauauugaaacccacggcauggugccaaugaauugcugacccgaugaucgg
cgugggcuaccggcgauagcgcaacgcgaaacgcgaauuggugcagcggaucguuaucac
ccgagugugaucacugggucguggggaauagaucaggccacggcguaaucacgacgcg
cuguaucguggaucuuuucugcgaucuuuccgcccggugcaguaugaaggcgcgga
gccgacaccacggccaccgaauuuuugcccgaugacgcgcguggaugaagaccag
ccuuucccgugugccgaaauugguccaucaaaaaauggcuuucgcuaccuggagagacg
cgcccgcgauccuuugcgaaucgcccacgcgaugggguaacagucuuuggcgguuucgcu
aaauacuggcaggcgguuucgucaguuacccgguuacagggcgguucgucugggacugg
guggaucagucgugauuuuuuauugaauaacggcaaccggugucggcuuacggcggu
gauuuuuggcgauacgccgaacgaucgccaguuucuguaugaacggucugguuuugccgac
cgacgcccgaucacgagcgcgacggaagcaaacaccagcagcaguuuuuccaguuuccgu
uuauccgggcaaaccaucgaagugaccagcgaaauccguuuccgucagcgaauaacgag
cuccugcacuggauggugggcguggaugguaagccgugggcaagcggugaagugccucug
gaugucguccacaagguaaacaguugaauaacugccugaacuaccgagccggagagc
gccgggcaacucuggcucacagucgcuagugcaaccgaacgcgaccgcauggucagaa
gccgggcacauacagcgccuggcagcaguggcgucuggcggaauaccucagugugacgcuc
cccggcgguccacgccaucggcaucugaccaccagcgaauggauuuuugcaucgag
cuggguauuaagcguggcauuuaaccgccagucaggcuuucuuucacagaugggauu
ggcgauaaaaaacuacgucagcggcgugcgcgaucauuacccgugcaccgcuggau

Patentanmeldung CV007: Eine mRNA, stabilisiert und optimiert für die Translation in ihren translatierten Bereichen, für den Einsatz als Therapeutikum:

uuuuugauaaucucaugacaaaaaucccuuaacgugaguuuuucguuccacugagcgucag
 accccguagaaaagaucaaggaucuuuugagaucuuuuuuuucugcgcuuaucugcu
 gcuugcaaaaaaaaccaccgcuaccagcgguuuuuugccggaucagagcuac
 caacuuuuuuuccgaagguaacugggcuucagcagagcgagauacaaauacuguccuuc
 uaguguagccguaguuaaggccaccacuuaagaacucuguagcaccgcuacauaccucg
 cucugcuuaucuguuaccagugggcugcugccagugggcgaauagucgugucuuaccgggu
 uggacucaagacgaguuuaccggauaaggcgagcgugcgggcugaacggggggguucgu
 gcacacagcccagcuuggagcgaacgaccuacaccgaacugagauaccuacagcgugagc
 auugagaaagcgccacgcuuccgaaaggagaaaggcggaacagguauccgguaagcgga
 gggucggaacaggagagcgacaggggagcuuccagggggaacgcuugguauuuua
 guccugucggguuucgccaccucugacuugagcgucgauuuuugugaugcucgucagggg
 ggcgagccuauaggaaaaacgccaacgcgccuuuuuacgguuccugccuuuugcu
 ggccuuuugcucacauuuuuccugcguaucuccugauuucugggauaacgguauua
 ccgcuuugagugagcugauaccgucgcccagcgaacgaccgagcgagcgagucag
 ugagcgaggaagcggaagagcgccugaugcgguuuuuuccuuacgcaucugugcggu
 uuucacaccgcauauaggugcacucucagucacauucugcucugaugccgcauauaagcc
 aguauacacuccgcuauucgcuacgugacuggggcauaggcugcgccccgacaccgccaac
 acccgcuagcgcccugacgggcuugucugcucccggaucgcuacagacaagcugu
 gaccgucuccgggagcugcaugugcagagguuuuacccgucacaccgaaacgcgag
 gcagcuguggaaugugugucaguuaggugugggaaaguccccagcuccccagcagcag
 aaguaucaaaagcaugcaucaaauagucagcaaccagguguggaaaguccccagcuc
 cccagcaggcagaagauugcaaaagcaugcaucaaauagucagcaaccuauaguccgcc
 ccuaacuccgcccuaucggccccuaucuccgcccaguuuccgcccuaucuccgccccaugg
 cugacuaauuuuuuuuuuuuauugcagaggcgaggccgucggccucugagcuauucca
 gaaguagugaggaggcuuuuuugaggccuaggcuuuugcaaaaagcu

LacZ Sequenz, über erfindungsgemäßes Computerprogramm nach G/C-Gehalt optimiert, G/C Gehalt bei 69 %

aagcuggaccguacaaccugggcgggccgcauucuccgagcaacacguucugagcgguccgacaaggggcggggcacgcu
 gcacauagagcgagaagauacauugcagcuggggacugcugggcauccacgcgcgaagcugggcgagcccgauugccga
 gcgagggcuggaagggaucacugcgguacgcccggcgccgucgucggcgagggagggcaaggggccaccugga
 gcugagccgcgacauccgcccgcguuaacgcgcguuacggcgagauccgagcaccgguccgucggcgccgagcugg
 gagaacccgggcuacggggccgaaccgcuugggcgcgacccgcccguucgagcugggcgcaacagcgaggaggcgcg
 cagggaccgcccagcgggcgccugcgagccuagaacggcgagugggcgcuucgugguuccggcgccggagggcguc
 ccggagagcugggcugagugcgaccugccggagggcgacacggucgucgucgcccagcaacuggggcaugcacggcuacg
 acgcccgaucuaacgaacgucacguaccggaucacgguaacccgcccguucgcccagcgagaaccgacgggcugcu
 acagccugagcuuaacgucgagcagcugggcugggcgagggcgccagcgcaucauucgagggcguaacagcgcg
 uuccaccuguggucaacggccgucgggucggcuacggcgagccgagccgagcagguucgaccugagcgcgcu
 uccugcgcgcgggcgagaaccgcuugggcggaugguccugcgugggagcgacggcgagcuaccugggagggcgacau
 guggcgcaugagcggaucuuuccgagcugacgucgucacaaagccgagcgagggcaucagcgacuuccacgucgga
 cgcgcuuaacgagcagcuacggcgccgucgucgggagggcgagggcgauugcgcgagcugcgcgacuaccugcg
 cgucacggucagccugggggcgagacggcgucgagcgggcagggcgccguucggcgaggaucacgagcag
 cgggcgccuacgggacggcgucacgucgcccgaacgucgagaacccgaagcuguggagcgcgaggauccgaaccu
 guaccgcgcgucgucgagcugcacacggcgagggcacgcugaucgagggcgagggcgugcgagcugcgcuuccgag
 guccgcaucgagaacggccugcugcugcugaacggcaagccgucgugauccgcgcguaaccgccagagcaccacc
 gcugcacggcgcgcuauaggacgagggcacgaugugggcgacauccugcugauagaagggaacaacuucaacgcggucc
 gcugcagccacuaccggaaccaccgcuugguuacacgucgugcgaccgcuacggccuagucgucgagcagggcgaa
 aucgagacgcagggcaugguccgaugaaccgcuagcggacgacccgcgucggcugccggcgauagcgagcgcgucac

[illegible]

12

aguucacgcacauacuuccgccugaucugaaacucaucucaaccugaagggcagccgcugacgcagcuuccgauc
aucagcugaccgaagagccugaacgucagcuuccgcagcacggagcgcggcacgccgugaaagcgcagcaaggaccugcu
ggagaucuguuucugcgcgugaagcgcggcgugcaagggcaagaaccaccgcuacggccgcugguucgucugccgc
aucaagagcuacggccuguuuuccgccgugacuuggcgagcgcggagcgcggcuacggcauccugagcuucgugaugca
gccgcagcugagcgcagcagcgcgcacgcugugacaccgccugcacacgagccugugcugaagcugcuacggcuggcg
cugccggugcgcgaucagccgcgucuccgcggggcugagcggggcagcagcagcuaccgcauccgccgcagcggccgcgcgga
gcgcgggcguccgcgcgcacagcccggcguggagcgcgcggcagccgaacugagacacguacagcgucagcaucgaga
aggcgccgcgcuuuccgaagggcgagcgcgcgcagggcauccgugagcggcgggcagcgcggggcgagcgcgcgcgcg
cagcuucggcgggcgagacgcggggcaucucaucguccugagcggcuucgcgacgagcgcaccugagcgcugcgcgcg
gacgcgcgcggcgggcgggcgguacggcaagacgcggcgacgcgcggcuucacggcagcugggccguucgcggggcc
ugcugcugacgugcagcuuccgcgcuaaccgcgugauccugggauacaggguccgcggccgcgugagcgcgagcuauccc
gcuggcgggcgggcgcgcggcgagcgcggcgagcgcgcgcaagcgcgaagagcgcgcgugaugcggcaucuucage
cugcgcaucugcgcggguuuccacacggcguaacggcgcgugagcgcgcgcgagcgcgcgugaugccgcacagcugagcga
gcauccacagcgcgaucgcgacgugacuggggccacggcgucgcgcggcagccggcgaaacacgcgcgacgcgcgcgacg
ggccugagcgcgcggggcauccgccugggcacgagcugcgcaccgccugcgcgagcugcagcgcgagggcuucacgg
ucaucacggagacgcgcgagggcgggcgucgagugcgcgacgucggcgcgucggaaggucccgccugccgagccgcgg
caaguacgcgaagcacgcgagcggccugguacgaacggcgucggaaggucccgccugccgagccgcggcaaguacg
cgaagcacgcgagcggccugguacgaacacagcccggcgccgaacagcgcgcacccggcgccgaacagcgcggggcuucc
gcccguucagcgcgcgguggcugacgaacuucuucacugcgcggcgccgcggccugggccugugagcgaucgg
ggaggucgucggccgcgucugggcgccgcgcgucgugggcaaggcg

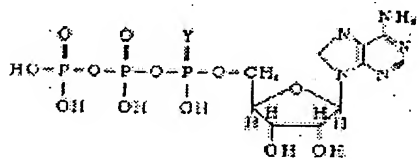


Abbildung 1: Nucleotidanaloga: Purinphosphorothioat (Y = Position der Substitution z.B. durch Schwefel)

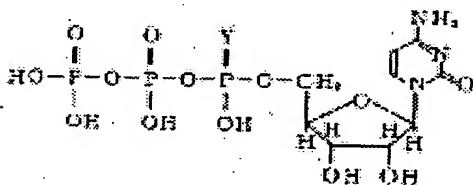


Abbildung 2: Nucleotidanaloga: Pyrimidinphosphorothioat (Y = Position der Substitution z.B. durch Schwefel)

12.01.2011